

塩漬桜葉使用食品の保存料およびクマリンの一斉分析法の検討

鈴木裕司 鈴木智子 須釜久美子 笹原賢司
衛生研究所

要 旨

塩漬桜葉使用食品（桜餅）の保存料分析において、デヒドロ酢酸のリテンションタイムに妨害ピークが認められた。移動相等の測定条件を改良した結果、妨害ピークに影響されることなく、安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸は良好に分離された。

妨害ピークを示す物質を同定したところ、塩漬桜葉由来のクマリンであることが判明した。今回改良した方法では保存料に加え、クマリンの定量も可能であった。市販の塩漬桜葉 3 製品の保存料およびクマリンの分析を実施した結果、すべての葉から安息香酸が 0.028 ～ 0.043 g/kg、クマリンが 0.641 ～ 2.08 g/kg 検出された。

キーワード：塩漬桜葉，保存料，安息香酸，デヒドロ酢酸，クマリン

はじめに

保存料（安息香酸（BA），ソルビン酸（SOA），デヒドロ酢酸（DHA）以下：保存料）の分析は、一般的に水蒸気蒸留による抽出後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いて定量する。しかし、当所で使用していた HPLC 用のカラム Shim-pack VP-ODS では、デヒドロ酢酸のリテンションタイム（以下：RT）に桜餅の原材料由来と思われる妨害ピークが認められ、デヒドロ酢酸の定量が困難であった。今回、検討した結果、分析の妨害ピークを示す物質（以下：妨害物質）はクマリンと同定され、保存料とともに一斉分析が可能となったので、その概要を報告する。

材 料

1 試料

市販の塩漬桜葉 3 製品（表 1），収去品（桜餅および桜餅の葉：収去検査に用いた試料溶液）を用いた。

2 試薬等

SOA, DHA は食品分析用（関東化学社製）を，BA, クマリンは特級（和光純薬社製）を用いた。その他の試薬は特級，溶媒は HPLC 用を用いた。

表 1 市販の塩漬桜葉製品

産 地	内容量	原材料名
日 本	50 枚入り	桜の葉，食塩，ミョウバン，pH 調整剤（クエン酸ナトリウム），pH 調整剤（クエン酸）
日 本	10 枚入り	桜の葉（大島桜葉），食塩，クエン酸，焼ミョウバン
中 国	10 枚入り	桜の葉，精製塩，ミョウバン

方 法

分析に係る前処理方法等については平成 22 年 5 月 28 日付けで改正された「食品中の食品添加物分析法」^{1, 2)} に準拠して行った。

1 標準液の調製

保存料およびクマリンについて，検量線用標準液を 0, 0.1, 1, 2, 5, 10 μg/mL に調製した。

2 装置および測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ：Prominence（島津社製）

2) 測定条件

カラム温度：40 °C，流速：1.0 mL/分

注入量：20 μL

UV 検出器の測定波長：230 nm

PDA 検出器の波長範囲：200 ～ 600 nm

3) 分析に用いた分析カラム及び移動相
 (1)分析カラム

- ① Shim-pack VP-ODS (島津社製)
 (5 μm, 4.6 mm ID×150 mm)
- ② Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)
 (5 μm, 4.6 mm ID×150 mm)

(2)移動相

- ①メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L
 クエン酸緩衝液 (1 : 2 : 7) (以下:クエン酸液)
- ②メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液
 (36 : 59 : 5) (以下:リン酸液)

3 分析法の改良

1) 妨害物質の同定

文献³⁾から、妨害物質はクマリンであることが疑われたが、保存料およびクマリンの各標準液、桜餅および桜餅の葉の試料溶液を測定し、RT と吸収スペクトルの類似度を確認することにより妨害物質の同定を行った。

2) 分析カラムの検討

方法の測定条件に示したカラムおよび移動相を使用し、保存料およびクマリンの 10 μg/mL の混合標準液を測定してピークの分離状況についての検討を行った。

3) 移動相の検討

Inertsil ODS-3 を用いて、保存料およびクマリンの各ピークが良好に分離できる移動相組成の検討を行った。

4 保存料およびクマリンの添加回収試験

塩漬桜葉は中央脈を取り除き左右に分け、各 4～5 g になるようにホモジナイザーカップに秤取し、一方に保存料およびクマリン (各 2,500 μg) を添加して添加回収試験を行った。

5 市販の塩漬桜葉の定量

市販の塩漬桜葉 3 製品について、葉 1 枚毎 (n=3) の保存料およびクマリンを定量した。

結果および考察

1 妨害物質の同定

保存料およびクマリンの各標準液、桜餅

および桜餅の葉に認められた妨害物質の各 RT を表 2 に示す。

桜餅および桜餅の葉の妨害物質の RT は、クマリンのものとはほぼ同じであるが、DHA の RT とも近接しているため、吸収スペクトルの類似度についても確認した (表 3)。妨害物質の吸収スペクトルはクマリンのものと類似度がほぼ 1 であり、妨害物質はクマリンと同定された。

表 2 標準物質と妨害物質のRT

物質名	RT (分)
BA	6.147
SOA	7.126
DHA	9.230
クマリン	9.302
妨害物質 (桜餅)	9.301
妨害物質 (桜餅の葉)	9.300

表 3 吸収スペクトルの類似度

	DHA	クマリン
桜餅	0.777670	0.999976
桜餅の葉	0.778641	0.999994

2 分析カラムの検討

方法に示したクエン酸液の移動相で測定した結果を図 1 に示す。Shim-pack VP-ODS では DHA およびクマリンのピークが完全に重なった。Inertsil ODS-3 では DHA およびクマリンのピークの分離はできたが、低濃度の DHA の測定は難しいと考えられた。

方法に示したリン酸液の移動相で測定した結果を図 2 に示す。Shim-pack VP-ODS では、SOA および DHA のピークが完全に重なった。Inertsil ODS-3 では、SOA および DHA のピーク

クマリンの分離はできたが、不十分と考えられた。このことから、保存料の分析にはクエン酸液を使用した移動相が良いと判断された。

カラムの分離性能を検討した結果、今回の分析では Inertsil ODS-3 の方が高かった。

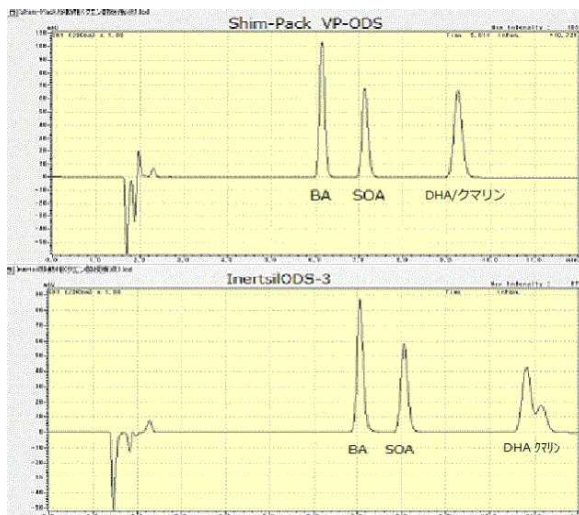


図1 メタノール・アセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (1 : 2 : 7) のクロマトグラム

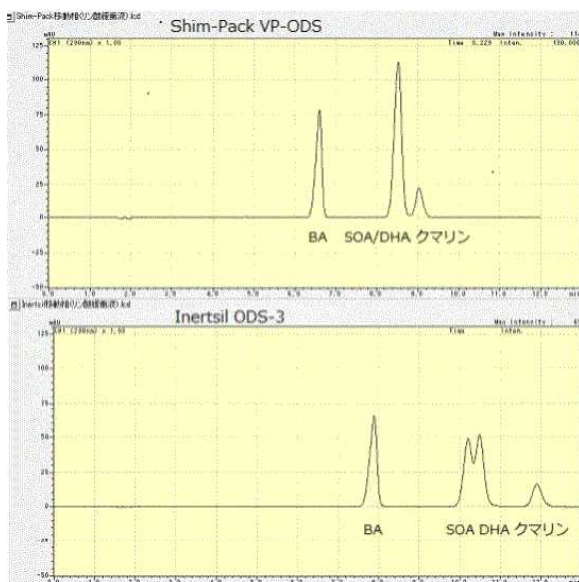


図2 メタノール・水・0.2 mol/Lリン酸緩衝液 (36 : 59 : 5) のクロマトグラム

3 移動相の検討

移動相の組成について検討した結果、メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液 (5 : 1 : 14) およびアセトニトリル

・5 mmol/L クエン酸緩衝液 (2 : 8) では、すべてのピークを良好に分離できた (図3)。今回は、より調製が簡単で DHA およびクマリンの RT の差が大きいアセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液 (2 : 8) の移動相を用いることにした。

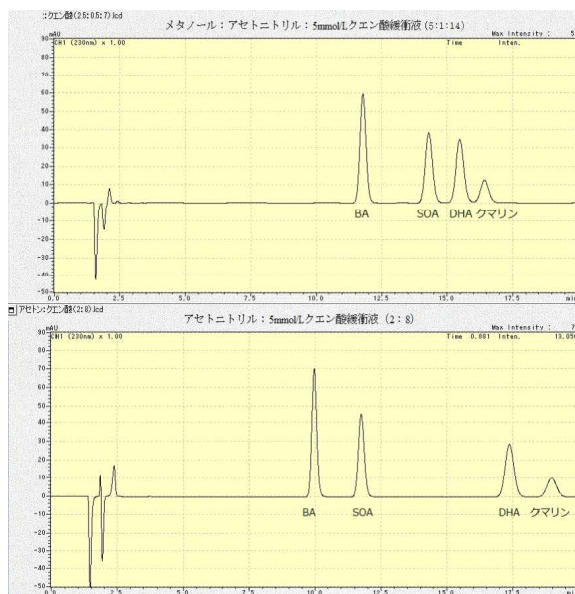


図3 メタノール・アセトニトリル・5mmol/Lクエン酸緩衝液 (5 : 1 : 14) およびアセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (2 : 8) のクロマトグラム

4 保存料およびクマリンの添加回収試験

塩漬桜葉の添加回収試験の結果を表4に示す。それぞれの回収率は 94.6 ~ 103.5 % となり、良好な結果が得られた。また、クマリンは水蒸気蒸留で抽出できたため、今回検討した方法により保存料およびクマリンの一斉分析は可能であると考えられた。

表4 添加回収試験

	塩漬桜葉 (4.50 g) (g/kg)	塩漬桜葉 (4.24 g) +STD 添加 (g/kg)	回収率 (%)
BA	0.045	0.632	99.7
SOA		0.558	94.6
DHA		0.584	99.1
クマリン	0.860	1.47	103.5

5 市販の塩漬桜葉の分析結果

市販の塩漬桜葉 3 製品について分析した結果、すべての製品から BA (0.028 ~ 0.043 g/kg) およびクマリン (0.641 ~ 2.08 g/kg) が検出された (表 5) . クマリンの含量は製品により異なった.

SOA および DHA は、検出されなかった.

表 5 塩漬桜葉 1 枚毎の BA およびクマリン含量

	1枚の重量 (g)	BA (g/kg)	クマリン (g/kg)
日本産50枚入り1	1.33	0.034	0.853
2	1.11	0.043	0.641
3	1.56	0.036	0.807
平均	1.33	0.038	0.767
日本産10枚入り1	1.34	0.028	1.59
2	1.07	0.032	1.55
3	1.10	0.034	2.08
平均	1.17	0.031	1.74
中国産10枚入り1	1.43	0.035	1.57
2	1.13	0.032	1.23
3	1.26	0.033	1.15
平均	1.27	0.033	1.32
総平均	1.26	0.034	1.27

5) 本法を利用して市販の塩漬桜葉の保存料およびクマリンを測定した結果、すべての試料から BA が 0.028 ~ 0.043 g/kg, クマリンが 0.641 ~ 2.08 g/kg 検出された.

引用文献

- 1) 食安基発 0528 第 3 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知. 「食品中の食品添加物分析法」の改正について: 2010/5/28
- 2) 衛化第 15 号 厚生省生活衛生局食品化学課長通知. 「食品中の食品添加物分析法について」: 2000/3/30
- 3) 倉田正治, 相澤直之, 平野治夫, 他. 三層分離抽出/蛍光分光光度法によるクマリンを含む油類の簡易識別分析. 分析化学 2003; 52(3): 187-194.

まとめ

- 1) 桜餅の保存料分析における DHA の妨害物質はクマリンと同定された. クマリンは、桜餅等から検出される桜の葉由来の天然香成分であり、桜の葉を半乾きにしたたり破碎・塩蔵することで、クマリンが生成されることが知られている.
- 2) Shim-pack VP-ODS および Inertsil ODS-3 の分離性能を検討した結果、今回の検討では Inertsil ODS-3 の方が高かった.
- 3) 保存料およびクマリンは、アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液 (2:8) の移動相を用いることにより、すべてのピークが完全に分離できた.
- 4) 分析法を改良した結果、添加回収試験の結果も良好であり、保存料およびクマリンの一斉分析が可能と考えられる.